

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2002-535616
(P2002-535616A)

(43) 公表日 平成14年10月22日 (2002. 10. 22)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

ターミナル* (参考)

G 0 1 N 27/447
27/416
33/483

G 0 1 N 33/483
27/26
27/46

F 2 G 0 4 5
3 1 5 K
3 2 5 E
3 3 6 G

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2000-593947 (P2000-593947)
(86) (22) 出願日 平成11年11月19日 (1999. 11. 19)
(85) 翻訳文提出日 平成12年9月11日 (2000. 9. 11)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 2 7 4 9 5
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 4 2 4 2 4
(87) 国際公開日 平成12年7月20日 (2000. 7. 20)
(31) 優先権主張番号 0 9 / 2 2 9 , 3 8 6
(32) 優先日 平成11年1月11日 (1999. 1. 11)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

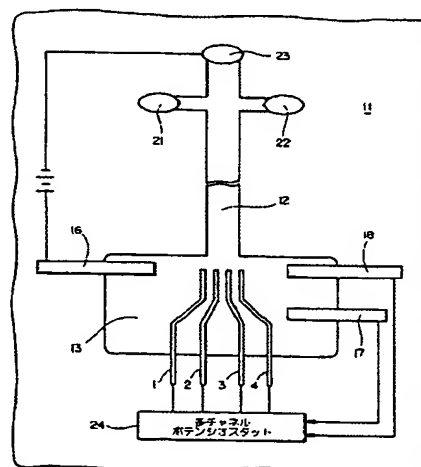
(71) 出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ カリフォルニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94607
-5200, オークランド, 12ティーエイチ
フロア, フランクリン ストリート 1111
(72) 発明者 マティース リチャード エイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94556 モラガ デインフィールド プレ
イス 93
(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミクロ製作キャピラリー電気泳動チップ及び複数のレドックス標識の同時検出方法

(57) 【要約】

本発明は、マトリックスコード一覧表を使用して複数のレドックス活性標識を同時に検出するためのミクロ製作キャピラリー電気泳動チップ、及び電気泳動又はクロマトグラフ分離後に、複数の標識-検体接合体の同時電気化学的検出のために選択的に検体を標識化する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 広くなって検出貯蔵部になる伸長された細い分離チャンネルと、このチャンネルに沿って分離電圧をかける手段である、前記細い分離チャンネル末端の近傍の前記検出貯蔵部中に伸長された2つ以上の間隔をおいて配置された薄膜作用電極と、前記検出貯蔵部中に前記作用電極から間隔をおいて配置された基底電極及び参照電極とを有する基板を含んでなるマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップであって、前記作用電極が、レドックス反応を起こす分子によって生じる電流を検出するために、該分子が前記チャンネルを下方に移動した後、前記薄膜電極を越えて移動するときに、高い電気泳動電位から最小の影響を受ける、マイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ。

【請求項2】 前記伸長された細い分離チャンネルが分岐して、各作用電極の末端の反対側に、複数の出口チャンネルを形成している請求項1に記載のマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ。

【請求項3】 前記作用電極の末端が、前記伸長された分離チャンネルの末端から100 μ m以下である請求項1又は2に記載のマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ。

【請求項4】 前記作用電極の末端が、前記チャンネルの末端から1,000 μ m以下である請求項1又は2に記載のマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ。

【請求項5】 前記分離チャンネルが、ゲルで充填されている請求項1又は2に記載のマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ。

【請求項6】 前記チャンネルが、クロマトグラフ分離媒体で充填されている請求項1又は2に記載のマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ。

【請求項7】 前記基底電極及び参照電極が、薄膜電極である請求項1又は2に記載のマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ。

【請求項8】 検体複合混合物中の検体の選択的な電気化学的検出方法であって、以下の工程：

他の検体に結合される標識とは異なる電気化学シグナルを生じるレドックス標識で、前記混合物中の各検体を標識化する工程、

前記混合物を分離して、個々の標識化検体を与える工程、

前記分離された検体上の前記レドックス標識によって生じた異なる電気化学シグナルを同時に検出して、個々の検体を同定する工程を含んでなる方法。

【請求項 9】 前記異なる電気化学シグナルが、同時に、個々の作用電極に異なる電圧をかけ、かつ前記レドックス標識の酸化及び／又は還元を検出することによって検出される請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 前記異なる電気化学シグナルが、複数の電極における異なる検体の異なる不均一電子伝達速度定数に基づいて検出される請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】 前記異なる電気化学シグナルが、複数の電極における電気化学シグナルの同時ボルタンメトリー検出によって検出される請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】 前記異なる電気化学シグナルが、複数の電極における電気化学シグナルの正弦波ボルタンメトリー検出によって同時に検出される請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】 前記検体が、電気泳動的に分離される請求項 8、9、10、11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】 前記検体が、クロマトグラフ的に分離される請求項 8、9、10、11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 15】 検体複合混合物中の検体の選択的な電気化学的検出方法であって、以下の工程：

他の検体に結合される標識とは異なる電気化学シグナルを生じるレドックス標識で、前記混合物中の各検体を標識化する工程、

前記混合物を分離して、個々の標識化検体を与える工程、

前記分離された検体上の前記レドックス標識によって生じた異なる電気化学シグナルを検出して、個々の検体を同定する工程を含んでなる方法。

【請求項 16】 前記異なる電気化学シグナルが、前記混合物中の少なくとも 1 つの作用電極に異なる電圧をかけ、かつ前記レドックス標識の酸化及び／又

は還元を検出することによって検出される請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記異なる電気化学シグナルが、前記少なくとも1つの電極における異なる検体の異なる不均一電子伝達速度定数に基づいて検出される請求項15に記載の方法。

【請求項18】 前記異なる電気化学シグナルが、前記少なくとも1つの電極における電気化学シグナルの同時ボルタンメトリー検出によって検出される請求項15に記載の方法。

【請求項19】 前記異なる電気化学シグナルが、前記少なくとも1つの電極における電気化学シグナルの正弦波ボルタンメトリー検出によって同時に検出される請求項15に記載の方法。

【請求項20】 前記検体が、電気泳動的に分離される請求項15、16、17、18又は19に記載の方法。

【請求項21】 前記検体が、クロマトグラフ的に分離される請求項15、16、17、18又は19に記載の方法。

【請求項22】 検体混合物中の個々の検体を電気化学的に検出する方法であって、以下の工程：

他の検体に結合される標識とは異なる電気化学シグナルを生じるレドックス標識で、前記混合物中の各検体を標識化する工程、

前記混合物を電気泳動分離チャンネル中で分離する工程、

1つ以上の電気化学的検出電極を、前記分離チャンネルの末端又は末端近傍に配置する工程、及び

前記1つ以上の検出電極のそれぞれで前記レドックス標識によって生じた異なる電気化学シグナルを同時に検出して、一意的に個々の標識化検体を同定する工程

を含んでなる方法。

【請求項23】 前記検体混合物が4つの検体を含み、かつその検体のうちの2つが酸化性標識で標識化され、2つが還元性標識で標識化されている請求項22に記載の検体混合物中の個々の検体を電気化学的に検出する方法。

【請求項24】 前記混合物が4つの検体を含み、かつその4つの検体が、

4つの異なる酸化性又は還元性標識で標識化されている請求項22に記載の検体混合物中の個々の検体を電気化学的に検出する方法。

【請求項25】 前記混合物中の各検体用に、1つの電気化学的検出電極がある請求項22に記載の検体混合物中の個々の検体を検出する方法。

【請求項26】 DNA鋳型の配列を決定する方法であって、以下の工程：
配列決定されるDNA鋳型の可能性のあるすべての相補的配列決定断片を生成し、かつレドックス標識化する工程であって、4つの異なる塩基（A、C、G、T）で終結する断片のセットが、別個のセット又は断片のそれぞれに結合された前記レドックス標識によって生成される別個の電気化学シグナルによって同定される工程、

単一チャンネル又はレーン中で、前記標識化断片のセットを電気化学的に分離する工程、及び

前記レドックス標識によって生成された異なる電気化学シグナルを同時に検出して、個々の断片を同定する工程
を含んでなる方法。

【請求項27】 前記断片が、プライマー又はターミネーターを利用するジデオキシ終結法で生成され、かつ前記プライマー又はターミネーターが、レドックス標識で標識化される請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記異なる電気化学シグナルが、前記混合物中の各断片に対して1つの電極である、複数の電極における異なる不均一電子伝達速度定数に基づいて検体を検出することによって検出される請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記異なる電気化学シグナルが、複数の電極における電気化学シグナルの同時ボルタンメトリー検出によって検出される請求項26に記載の方法。

【請求項30】 前記異なる電気化学シグナルが、複数の電極における電気化学シグナルの正弦波ボルタンメトリー検出によって同時に検出される請求項26に記載の方法。

【請求項31】 前記プライマー又はターミネーターのうちの2つが、酸化性レドックス標識で標識化され、かつ2つが還元性レドックス標識で標識化され

る請求項26に記載の方法。

【請求項32】 前記4つのプライマー又はターミネーターのそれぞれが、異なる酸化性又は還元性レドックス標識で標識化される請求項26に記載の方法。

【請求項33】 異なるヒドロキノン誘導体が、DNA-プライマー、ターミネーター又はヌクレオチドトリホスフェートに結合されて、配列断片のセットを電気活性にする請求項26に記載の方法。

【請求項34】 配列断片が、ジデオキシ鎖終結法で生成され、かつ鎖伸長に使用される3'-OHヌクレオチドトリホスフェートが、電気化学標識で標識化される請求項26に記載の方法。

【請求項35】 電気化学的検出を用いて核酸遺伝子分類を行う方法であって、以下の工程：

混合物中の各核酸検体を、他の検体に結合される標識とは異なる電気化学シグナルを生じる特異的なレドックス活性標識で標識化する工程、

ゲル充填キャピラリー又はチャンネル中で、前記混合物を電気泳動的に分離する工程、

2つ以上の電気化学的検出電極を、前記分離キャピラリー又はチャンネルの末端又は末端近傍に配置する工程、

前記検出電極のそれぞれで前記レドックス標識によって生じた異なる電気化学シグナルを同時に検出して、個々の標識化検体を一意的に同定する工程を含んでなる方法。

【請求項36】 遺伝子分類される前記核酸検体が、少なくとも1つが特異的な電気化学標識で標識化されている正プライマー及び逆プライマーを使用するポリメラーゼ鎖反応によって生成される請求項35に記載の方法。

【請求項37】 増幅及び標識化された核酸検体が、制限酵素によって消化されて、遺伝子分類のための標識化かつ制限された断片を生成する請求項36に記載の方法。

【請求項38】 遺伝子分類される前記核酸検体が、短いタンデム反復断片である請求項36に記載の方法。

【請求項39】 前記レドックス標識が、異なるヒドロキノン誘導体である請求項36に記載の方法。

【請求項40】 前記異なる電気化学シグナルが、異なる不均一電子伝達速度定数に基づいて検出される請求項36に記載の方法。

【請求項41】 前記標識化核酸検体が、相補的鋳型媒介反応で2つのオリゴヌクレオチドを連結することによって生成され、その連結されるオリゴヌクレオチドの少なくとも1つが、特異的なレドックス活性標識で標識化され、かつその連結され標識化された核酸検体の存在が、前記相補的鋳型配列の存在の診断上役立つ、請求項35に記載の方法。

【請求項42】 前記標識化核酸検体が、レドックス標識化プライマー又はレドックス標識化ターミネーター又はレドックス標識化ヌクレオチドトリホスフェートのいずれかを用いる、ポリメラーゼとのプライマー及び鋳型媒介伸長反応を行うことによって生成され、かつ前記鋳型配列中の特定塩基の同一性の決定が、単一のヌクレオチドの多型性を定義する請求項35に記載の方法。

【請求項43】 本質的にレドックス活性な検体の複合混合物中の検体の選択的な電気化学的検出の方法であって、以下の工程：

キャピラリー又はチャンネル中で前記混合物を電気泳動的に分離する工程、

2つ以上の電気化学的検出電極を、前記分離キャピラリー又はチャンネルの末端又は末端近傍に配置する工程、

前記検出電極のそれぞれで前記レドックス活性検体によって生じた異なる電気化学シグナルを同時に検出して、個々の検体を一意的に同定する工程を含んでなる方法。

【請求項44】 前記異なる電気化学シグナルが、前記混合物中の各断片に対して1つの電極である、複数の電極における異なる不均一電子伝達速度定数に基づいて検体を検出することによって検出される請求項43に記載の方法。

【請求項45】 前記異なる電気化学シグナルが、複数の電極における電気化学シグナルの同時ボルタンメトリー検出によって検出される請求項43に記載の方法。

【請求項46】 前記異なる電気化学シグナルが、複数の電極における電気

化学シグナルの正弦波ボルタンメトリー検出によって同時に検出される請求項4
3に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(政府の援助)**

本発明は、米国エネルギー省によって与えられた契約番号FG03-91ER61125の下に、政府の援助で為された。政府は、本発明に対して一定の権利を有する。

(発明の簡単な説明)

本発明は、マトリックスコード一覧表を用いて複数のレドックス活性標識を同時に検出するためのマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ、及び電気泳動又はクロマトグラフ分離後、複数の標識-検体接合体を同時に電気化学的検出するために検体を選択的に標識する方法に関する。

【0002】**(発明の背景)**

キャピラリー電気泳動法 (CE) は、スラブゲル電気泳動法の伝統的アプローチに比し、その必要な試料量が少ないこと、高い効率及び分離が速いことにより、DNA配列決定及び断片の分子量決定用の強力な手段として提供されている (Swerdlow, H. 及び Gesteland, R., (1990) Nucl. Acid. Res. 18, 1415-1419) (Kheterpal, I., Scherer, J. R., Clark, S. M., Radhakrishnan, A., Ju. J., Ginther, C. L., Sensabaugh, G. F. 及び Mathies, R. A., (1996) Electrophoresis 17, 1852-1859)。さらに最近、マイクロ製作 CE デバイス及びキャピラリー配列電気泳動 (CAE) ミクロプレートが、DNAの分子量決定及び配列決定試料の迅速な平行分離にその効力を示している (Woolley, A. T. 及び Mathies, R. A., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 11348-11352) (Woolley, A. T. 及び Mathies, R. A., Anal. Chem. 67, 3676-3680, 1995) (Woolley, A. T., Sensabaugh, G. F., 及び Mathies, R. A., (1997) Anal. Chem. 69, 2256-2261) (Simpson, P. C., Roach, D., Woolley, A. T., Thorsen, T., Johnston, R., Sensabaugh, G. F., 及び Mathies, R. A., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 2256-2261)。これらの小型化 CE プラットホームの開発は、完全に統合され、安価で持ち運びのできる分析システムを作るというコンセプトによって進められている。

【0003】

電気化学的 (EC) 検出は、感度又は選択性を何ら犠牲にすることなく小型化 CE プラットフォームに容易に適合できるアプローチである。EC 検出は、種々の検体の高い感度的かつ選択的検出用の溶融シリカキャピラリーにおける従来の CE で広く使用されている。この応用の重大な問題は、どのようにして電気化学的検出システムから高い電気泳動分離電流をデカップルするかを見出すことである。Wallingford 及び Ewing は、まず多孔性ガラス原料によるカラム上の割れ目を使用して、小さい電気化学シグナルから高い電気泳動電流をデカップルすることを開示した (Wallingford, R. A. 及び Ewing, A. G., (1987) *Anal. Chem.* 59, 1762-1766)。多孔性ガラス原料は、キャピラリーの出口で釣り合わされている検出電極より先に電気泳動電流をアースする方法を与えた。緩衝液中の検体は、キャピラリー中に存在する残りの電気浸透流によって、検出電極に汲み上げられた。検出電極からの分離電場の効果的なデカップルにより、このスキームは、検体の高感度検出を可能にした。しかし、このシステムは、繊細な多孔性ガラス原料のため非常に脆く、かつキャピラリーの出口に電極を整列させることが難しかった。それ以来電気泳動電流を分離するために、多孔性ナフィオンチューブ (O'Shea, T. J., Greenhagen, R. D., Lunte, S. M., Lunte, C. E., Smyth, M. R., Radzik, D. M. 及び Watanabe, N., (1992) *J. Chromatogr.* 593, 305-312)、及びパラジウムジョイント (Kok, W. T., 及び Sahin, Y., (1993) *Anal. Chem.* 65, 2497-2501) を含む多くの他の設計が使用されてきた。これらの設計はすべて非常に脆弱で、丈夫な CE-EC システムの構築には受け入れられない。そこで、カラム上の割れ目デザインの代替として小径キャピラリーの末端カラム検出が提案された (Huang, X. H., Zare, R. N., Sloss, S., 及び Ewing, A. G., (1991) *Anal. Chem.* 63, 189-192)。このアプローチは、より小さい内径 ($< 10 \mu\text{m}$) のキャピラリーは、そのずっと小さい領域のため非常に低い電気泳動電流を示すという事実を利用した。従って、電気泳動電流のための隔離が不要であり、それによってカラム上の電流デカップラーも不要になった。EC 検出は、フェムトモルからアトモル質量範囲の種々の検体を検出限度とする、直径 $2 \mu\text{m}$ 程度の溶融シリカキャピラリー (Olefirowicz, T. M. 及び Ewing, A. G., (1990) *Anal. Chem.* 62, 1872-1876) におけるキャピラリー電気泳動用の検出方法としてうまく使用されている。同様の直径の電気泳動用キャピラリーは

、より小径の電極、又は微小電極を使用する必要がある。これら微小電極では、バックグラウンド荷電電流の著しい減少のためバックグラウンドノイズがより低い (Bard, A. J. 及び Faulkner, L. R., (1980) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York, John Wiley and Sons)。これは、高い S-N 比のためより良い濃度感応性を導く。これら微小電極では、高電量効果のため質量感応性も、より大きい電極以上に高められる (前出の Huang, X. H. ら)。従って、末端カラム検出は、感度のいずれの損失もなく CE-EC アプローチをうまく達成させる。しかし、このような小径のキャピラリーの出口に微小電極を正確に位置づけるためには、非常に高価な微細位置決め装置が必要である。結果として、この設計を使用すると、実験間の再現性が非常に乏しい。多くの研究者が、CE-キャピラリーの外側の適所に電極を接着する種々の方法を試みてきたが (Fermier, A. M., Gostkowski, M. L., 及び Colon, L. A., (1996) *Anal. Chem.* 68, 1661-1664) (Chen, M. C. 及び Huang, H. J., (1997) *Anal. Chem. Acta.* 341, 83-90)、このアプローチは、極小径キャピラリーにより未だ非常に冗漫かつ再現性がない。また、小さいキャピラリー電極を配列したこのようなアセンブリを多数確実に作ることは非常に困難である。従って、従来のキャピラリー及び電極による末端カラム検出は、日常的かつ自動化分析では役に立たない。

【0004】

マイクロ製作チャネルの出口における電極のマイクロ製作は、電極が高い精度及び再現性で永久的に作製されうるので、日常的に末端カラム検出を行うことを可能にする。最近、完全なマイクロ製作システムに関する CE-EC 検出へのアプローチが、Woolley らによって示された (Woolley, A. T., Lao, K., Glazer, A. N. 及び Mathies, R. A., (1998) *Anal. Chem.* 70, 684-688)。白金微小電極が、ガラスプレートにエッチングされた CE-チャネルの出口に作製され、末端カラム検出様式の電気泳動電流から検出システムを有効に隔離させる。アトモル範囲の検出限度による神経伝達物質の感受性検出が、高い再現性で達成された。電気化学的検出が統合されたマイクロ製作キャピラリーチップを使用して、高感度の DNA 制限酵素断片解析及び PCR 生成物の分子量決定を行う可能性も示された。DNA 断片は、電気泳動緩衝液に電気活性インターカレーター、鉄-フェナントロリンを添加す

ることによって間接的に検出された。このアプローチを用いて ϕ x HAE-III制限消化が検出された。603塩基対 (bp) 断片の検出限度は30zeptomolぐらいであり、サルモネラ菌からのPCR生成物は、内部制限酵素断片標準に対して容易に分子量決定された。このことは、マイクロ製作CE-ECシステムは、高感度検出の能力があることを示している。

【0005】

しかし、間接的な検出は、所望の検体の検出に対して特異的でないので、複雑な混合物中の特定の典型的検体の選択的な検出には適さない。さらに、我々の以前の研究では、間接的かつ非-共有結合性のレドックス活性標識はただ一つしかなかったもので、シグナルが重なってしまい、未知のDNA断片の大きさをそれ又は標準と比較することはさらに困難であった。検体の直接標識化は、一般に種々の検体の選択的な同時多重検出を達成するのに必要とされる。例えば、蛍光に基づいたDNA配列決定の場合、サンガーデオキシ法によって生成された4つの各塩基終止ラダーの同時検出に、4つの異なった蛍光標識が必要とされ使用された (Sanger, F., Nicklen, S., 及びCoulson, A. R., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463-5467) (Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. 及びHood, L. E., (1986) Nature 321, 674-679) (Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zaguesky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. 及びBaumeister, K., (1987) Science 238, 336-341)。これらの研究では、特異的標識との伸展反応で用いられるプライマー又はターミネーターのいずれかを標識化することによって、4つの異なった配列決定断片ラダーに、特異的な蛍光標識が連結された。さらに、米国特許第5,436,130号は、単一のスラブゲルレーン又は電気泳動キャピラリーを使用するDNA配列決定法を開示している。配列決定断片は、前記レーン中で分離され、かつレーザー励起された共焦点蛍光スキャナーによって検出された。この場合、DNA配列決定断片の各セットは、同一のレーンで分離され、それから4セットの配列決定断片を特異的に標識化するために2つの異なった蛍光標識のみを利用する二進コード一覧表によって区別される。また、放射性同位元素標識を使用して同様に断片をコード化し、又は標識化する方法が記載されている。DNA配列決定用途

では、多重電気化学的標識化、分離及び検出方法の開発は明らかに有益である。また、DNA断片の多重標識化の同様の方法を開発して、RFLP、STR又はSNPアッセイ等を利用するDNA診断で使用することも有益である。CE-EC実験における複数標識の同時検出には、このような系によって生成される複数の電気化学シグナルの検出が可能な戦略の開発が必要である。異なった化合物間のレドックス電位の相異を、EC検出を用いた選択的測定に利用することができる。伝統的なボルタンメトリー法は、文献で広く使用されており、これらの相異を利用している (Kristensen, E. W., Kuhr, W. G., 及びWightman, R. M., (1987) Anal. Chem. 59, p. 1752)。しかし、これらの方法は、大きなバックグラウンド荷電電流を導く電極電位の速いスキニングを含む。これら大きい荷電電流によって生じる高いバックグラウンドノイズのため、感度に乏しい。

【0006】

(発明の目的及び概要)

本発明の一般的な目的は、複数電極を用いて複数の化学電気シグナルを同時に検出するための方法及び装置を提供することである。

本発明の他の目的は、特異的な標識又は検体の検出用に各電極が最適化された複数の電極を有するマイクロ製作CEチップを提供することである。

本発明のさらなる他の目的は、複数の検体の多重標識化と電気化学的検出のための方法及び装置を提供することである。

さらに、本発明の他の目的は、レドックス標識を検体に結合させ、電気泳動的に該検体を分離し、かつ電気化学的に個々に分離された検体を検出する方法を提供することである。

他の目的は、明確に検出可能な異なったEC-標識で、複数の検体を標識化する方法を開発することによって達成される。

【0007】

本発明の上述及び他の目的は、広くなって検出貯蔵部になる分離チャネルを含むマイクロ製作電気泳動チップであって、その分離チャネルの末端に近接して、前記検出貯蔵部中に伸長する複数の薄膜検出電極又は作用電極を有するマイクロ製作電気泳動チップによって達成される。本発明の他の目的は、検体とその電気泳動

チップ中で分離された後に、検体混合物中の検体に結合された異なるレドックス標識によって、前記検出電極で生成される電気化学シグナルを同時に検出する方法によって達成される。

別の目的は、同時に複数の検体を識別するために種々の検体を多重電気化学的標識化及びコード化する方法である。

さらなる目的は、電気化学的検出によって遺伝子分類及び配列決定を行うための分離、検出及び標識化方法を開発することである。

本発明の上記及び他の目的は、図面を参照しながら以下の説明を読むことで、さらに明瞭に理解されるだろう。

【0008】

(好ましい実施形態の説明)

複数の検体の高度に選択的な多重標識化及び電気化学的検出のための新規なアプローチについて記載する。レドックス標識は、DNA、RNA、ヌクレオチド、ペプチド及びタンパク質、炭水化物及びアミノ酸等のようなすべての可能な検体に結合させることができる。標識化された検体は、分離法と共に検出される。分離法は、CE、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)、ミセルクロマトグラフィー(MEKC)、等電集束法(IEF)、等速電気泳動法(ITP)、液体クロマトグラフィー(LC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、キャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)、キャピラリーゲル電気泳動法(CGC)、及び電気泳動又はクロマトグラフ的分離の他のいずれの形態でもよい。我々は、レドックス活性標識をオリゴヌクレオチドに結合させるアプローチを示すが、レドックス活性又は他の標識の他分子への結合について文献に記載されている他の合成経路も使用できる。特に、3又は4つの異なる電気化学標識を使用して、DNA配列決定実験における4セットの塩基ラダーの検出及び同定で必要とされるような、標識：標的接合体の選択的な電気化学的検出の概念を示す。複数のシグナルを同時に検出し、かつマトリックス値に基づく標識を特異的に同定できるマトリックスを基にしたコード一覧表を記載する。このコード一覧表は、レドックス活性電位及び／又は電極面における反応速度論によって相互に異なる種々のレドックス活性標識について使用できる。本方法は、電気化学的検出が

統合されたCE-チャンネルを用いて、電気泳動条件下、レドックス標識を検出することによって例証される。本コード化法は、他のレドックス標識の検出及び同定、又は検体が特徴的なレドックス特性を有する場合は標識化されない検体の検出のために同様の様式で利用できる。ミクロ製作され、分離の際、複数検体の同時検出のためにレドックス活性標識間のこれらの相異を利用できる新規なCE-ECチップの設計について記載する。

【0009】

ジー、トリ、テトラ、及びペンタヌクレオチド反復を含むような多重DNA配列の遺伝分析の一領域は、しばしば遺伝学的に多型である。EC標識化及び分析は、短い縦列の反復又はSTRsの分析に有用である。2000以上のこれら短い縦列の反復(STR)の多型性は、ヒトゲノムに関してマッピングされており、かつ発見されるべき数千以上が残存していると考えられている。このタイプの多型性の豊富さ及びポリメラーゼ鎖反応(PCR)による増幅後のSTR検出の容易さのため、STRsは、遺伝子マッピング研究でマーカーとしての広範な用途を見出してきており、かつ父系性及び人格的同一性の試験での用途に可能性のあるマーカーとして世に出てきている。遺伝子マッピング及び集団多型性データベースの開発におけるサイズ標準に対する複数のSTRマーカーの分析は、PCR段階で用いられるプライマーの多重レドックス標識化及び電気化学的検出によって達成することができる。同様のプライマー標識化法は、制限酵素断片長多型性(RFLP)の遺伝子分類又は種々のタイプの標識化ポリヌクレオチド連結アッセイでも使用できるだろう。また、核酸断片が未知の型に対するサイズ標準として独特な電気化学的標準化断片ラダーを使用することも可能であり、そのサイズ標準は、EC-標識化プライマー又はヌクレオチドを用いてPCRによって生成される。

【0010】

サンガーデオキシ鎖終結法(Sangerら, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463-5467 (1972))は、大規模な配列決定プロジェクトに受け入れられる方法である。プライマー又はターミネーターは、レドックス標識で標識化可能であり、分析されるDNA鋳型のすべての可能な断片を生成するのに使用され、4つの異なった塩基

(A、C、G、T)で終結する断片が分離され、かつ同時に電気化学的にその異なったレドックス電位によって同定される。多重レドックス標識化及び電気化学的検出は、すべて標識化及び遺伝的変異を決定するためにプライマー又はターミネーターを使用するRFLP分析、マイクロサテライト分析、及び単一ヌクレオチド多型性(SNP)分析のような遺伝子分類する他の方法と共に使用することができる。RFLP、STR、オリゴヌクレオチド連結アッセイ、及び単一ヌクレオチド多型性分類(本質的に配列決定する)の達成のために使用される方法では、標識化プライマー、標識化塩基又は標識化ターミネーターのいずれかを取り入れることができるので、電気化学的に活性な標識をどのように利用して、これらの全種類のアッセイを行うかを直ちに理解することができる。

【0011】

本発明の一観点に従い、4''-ガラスウェーハ11をエッチングしてCE分離チャンネル12と、検出貯蔵部13を形成した。一実施例では、該チャンネルは、幅 $33\mu\text{m}$ 及び深さ $14\mu\text{m}$ であった。1000オングストローム以下の厚さの白金(Pt)層を、RFスパッタリングによってウェーハ全体に被膜生成し、標準的なフォトリソグラフィーによってパターン化した。そして、熱王水(3:1, HCl:HN₃)で、硬く焼きつけられた(hard-baked)フォトレジストで保護されたPtパターンを残して、露光されたPt層をエッチングした。次いで、フォトレジストを除去して、図1に示されるような所望の電極パターンを露出させた。パターンは、PtのCE基底電極16、作用電極1~4、補助電極17、及び参照電極18を含む。作用電極は、幅 $10\mu\text{m}$ 、間隔 $5\mu\text{m}$ をあけて離し、かつ好ましくはCEチャンネルの出口から $20\mu\text{m}$ の間隔をあけて離した。作用電極は、該チャンネルの末端から $100\mu\text{m}$ 以下であることが好ましいが、該チャンネルの末端から $500\mu\text{m}$ 程度でもよい。CE電流からの作用電極の隔離後に、何らの有意な損失もなく分離カラムから溶出する検体を検出できるという原理は、以前に開示されている(Woolley, A. T., Lao, K., Glazer, A. N. 及びMathies, R. A., (1998) Anal. Chem. 70, 684-688) (Mathies, R. A., Glazer, A. N., Woolley, A. T., 及びLao, K., (1996) 米国特許出願第703, 394号; 1996年8月26日提出、「マイクロ製作キャピラリー電気泳動チップ上に組み込まれた電気化学的検出部」及び1997年8月22日に提出された一部継続

出願番号08/916, 557)。要するに、分離チャンネルが、広くなって該チャンネルの10～100倍の幅の検出貯蔵部になっている。電気泳動電流がこの貯蔵部に入ると、領域が大きくなり、かつ溶液の抵抗が減少するので、電気泳動電流は瞬時にアースされる。電気泳動電流からの干渉は、広くなっている点から20 μm に、作用電極を配置することで最少化される。検体の拡散損失は、作用電極がチャンネルの出口に近接して配置されているため最小である。結果として、作用電極で検出される検体濃度は高いが、電気泳動電流からのピックアップは最少化される。

【0012】

記載する実験では、特に言及しない限り、すべての分離は、単一の作用電極を有するマイクロ製作電気泳動チップを備えたキャピラリーゾーン電気泳動と同一条件下で行った。陽極23及び検出貯蔵部を浮かせながら、試料貯蔵部21に40秒間+400ボルトかけ、かつ試料廃物貯蔵部22をアースすることによって注入を行った。そして、陽極の貯蔵部に+400ボルトの高い正の電圧をかけ、かつ該貯蔵部をアースされる検出末端（陰極）に保持することによって、電圧を分離用に切り換えた。実験の際それぞれに+300ボルトをかけて、試料貯蔵部及び試料廃物貯蔵部をバックバイアスした。すべての分離は、分離緩衝液として25 mMのモルフォリノーエタンスルホン酸(MES、1 mM Cl^- と共に、 $\text{pH}=5.65$)を用いて行った。

【0013】

すべての電位は、参照電極18に対する相対値であり、低ノイズポテンシオスタット24 (Low-current module, BioAnalytical Systems, IN) を使用して印加した。シグナルは同一のポテンシオスタットで収集し、Apple Macintosh PowerBook 1400cで、Lab Viewソフトウェア及びDAQ-1200カード (National Instruments, TX) を用いて、5 Hzのサンプリング速度でデジタル化した。

【0014】

キノン及びヒドロキノンは、生物学的酸化還元プロセスの電気化学的研究でモデル化合物として広く使用され、その電気化学的性質がよく知られているので、初期分離用の標識の例として選択した (Enzyme and Metabolic Inhibitors, J. L. Webb, Academic Press, N. Y., Vol. 3, pp. 421-594 (1966))。これら化合物は、入手し

やすく、通常の実験条件下で扱い易く、複雑でない電気化学的反応性を示し、かつ広範な構造及び化学的性質を示すので有利である。これら化合物のレドックス電位は、種々の置換基、複素環芳香族性、環のひずみ及び溶媒に依存する。化学構造を変えることによってレドックス電位を調節する能力は、適度にレドックス電位に差のある非常に近接した関連化合物の系統群を生成する方法を与える。図2は、MECN又はEtOHのような有機溶液中で異なったレドックス電位 E_p を有する種々のキノイドレドックス標識の一覧を示す。4つの標識、すなわち、1,4-ジヒドロキノン(1)、1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸(2)、1-メチル,4-ベンゾキノン(3)、及び2,5-ジクロロ-1,4-ベンゾキノン(4)は有意に異なる電位で検出されるので、選択された。代表値を生成するのに使用される特定の試験及び溶媒条件下で、それぞれ、1及び2は、+0.46及び+0.23ボルトの正の(又は酸化)電位で検出され、3及び4は、-0.58及び-0.18ボルトの負の(又は還元)電位で検出される。

【0015】

検出チャネル間のクロストークのいかなる可能性も最小限にするために、標識の検出電位を選択して、相互に200mV以上の差があるようにする。2つの酸化性標識及び2つの還元性標識の使用により、図3に示されるようなマトリックスコード化法を用いてこれらのシグナルを説明する。特定の標識についての酸化電極におけるシグナルは、その電位でバックグラウンド以上に有意なシグナルが見られるかどうかによって、「正の高(+1)又は低(0)」として分類される。還元シグナル(反対の極性である)は、この場合もやはりその電極でバックグラウンド以上に有意なシグナルが見られるかどうかによって、「負の高(又は-1)及び低(0)」として分類される。より高い酸化電位(V_2)を有する標識は、最も高い酸化電極でのみ検出され、マトリックスコード(0, 1)が与えられる。これは、図3中の標識1によって例示され、この実験の特定条件下、電位 V_2 で酸化されるが、より低電位 V_1 に保持された電極では酸化されない。低酸化電位 V_1 を有する他の酸化性標識は、両方の酸化電極で検出されるので、それはコード(1, 1)が与えられる。同様に、2つの還元性シグナルは、(0, -1)及び(-1, -1)にコード化される。結果として、各標識は特異的な「符号付

き二進コード」又はマトリックス値を有し、それゆえ明解に同定できる。このコード化法は、検出シグナルを相互に分解する方法を与えるので、種々の標識化検体から電気化学シグナルの特異的な測定を確実にする。

【0016】

このアプローチを用いた2つの酸化性標識の選択的な電気化学的検出が、図4 A、4 Bに示されている。1 (1, 4-ジヒドロキノン) 及び2 (1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸) は、異なった電極電位を用いて選択的に検出される。検体をCEチャンネルに注入し、キャピラリーゾーン電気泳動法によって分離した。我々の実験条件では、1は+0.9ボルトのより高い酸化電位で容易に検出されるが、そのシグナルは、電極電位を+0.6ボルト以下に下げることによって完全になくなる(図4 A)。一方、同一条件下で、2は+0.9ボルト及び+0.6ボルトでも非常に容易に検出される(図4 B)。結果として、2つの酸化性標識は、+0.6ボルト(V_1)で2(のみ)を検出する電極と、0.9ボルト(V_2)で1及び2の両方を検出する電極とを釣り合わせることによって、相互に区別することができる。これらの検出電圧は、溶媒及び緩衝液の実験条件が異なるため、図2に示されるものとはいくらか相異なる。1についてのマトリックス値は、それが高電位電極でのみ検出されるので、(0, 1)であるのに対して、2のマトリックス値は、それが両電極で検出されるので、(1, 1)である。

【0017】

同様のアプローチが、図5 A、5 Bに示されるように、還元性標識の選択的検出について例示される。我々の実験条件下、3 (1-メチル, 4-ベンゾキノン) は、-0.4ボルト以上でのみ検出されるのに対して、4 (2, 5-ジクロロ-1, 4-ベンゾキノン) は、-0.2ボルトと-0.4ボルトで容易に検出される。従って、1つの電極を4のみの検出用に-0.2ボルトに合わせ、かつ他方の電極を3と4両方の検出用に-0.4ボルトに合わせることによって、2つの標識は区別される。3のマトリックス値は、それが最も負の電極でのみ検出されるので、(0, -1)であるが、4は両方の還元電極で検出されるので、(-1, -1)という値は4をコードする。4つの標識は、特異なマトリックス値を有するので、一意的にコード化され、結果的に確実に同定される。

【0018】

このコード一覧表で、他の組合せを使用できる。例えば、標識がそれぞれ異なるレドックス電位で反応する4つの酸化性（又は4つの還元性）標識を使用できる。図6は、酸化の場合に適用するマトリックス値を示す。各標識に対して値が特異的なので、複数のシグナルの完全な同定が可能である。この検出戦略は、単一分離で検出する必要のある電気化学的標識のいかなる数にも容易に増減される。「N」個の検体は、「N」個の異なる標識（酸化性及び還元性の両方）を該検体に結合させることによって検出されうる。選択性は、一般的に、それらのレドックス電位が約60mV以上離れるように設計された標識間で達成することができる（Bard, A. J. 及びFaulkner, L. R., (1980) *Electrochemical Methods; Fundamentals and Applications*, New York, John Wiley and Sons）。従って、混合物中の複数試料の分析は、所望の標的で標識を接合する各試料用の適切な標識を合成後、そのコード化された標識：標的接合体を検出して達成できる。

【0019】

選択的な電気化学的検出の別のアプローチは、電極面における不均一電子伝達速度定数(k^0)の異なるレドックス標識を設計することである。大部分の電極は、レドックス活性の非常に制限された電位窓（-1.0～+1.0ボルト）のみを示すので、レドックス電位差による選択的検出に使用可能な標識を限定する。しかし、分子のレドックス活性についての反応速度論は、種々の電極面で、 $10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$ から $10^{-9}\text{cm}^2/\text{s}$ に容易に変化しうる。従って、異なる k^0 値を有する標識を設計すると、レドックス電位差に比し、ずっと広範な選択性を与える。この k^0 の差を利用し、伝統的なボルタンメトリー法を用いて電気活性標識を選択的に検出できる。例えば、4種の検体は、異なるスキャン速度で検出電位範囲を横断して4つの電極を循環させることによって検出されうる。異なるスキャン速度は、1つの電極が1つの検体毎の検出用の k^0 に対応するようにオーダーを増やして選択される。最も遅い反応検体（最小 k^0 ）は、最も遅いスキャン電極のみで検出され、他のより速いスキャン電極では検出されない。次に遅い検体は、2つの遅いスキャン電極で検出されるなどである。この場合、レドックス電位を基礎とする選択性について、図6に示されたものと類似のコード一覧表が達

成されうる。しかし、これらボルタンメトリー法の感度は、高々マイクロモル濃度範囲なので、DNA配列決定生成物のような低レベルの検体を検出するには十分な感度ではない。その場合、正弦波ボルタンメトリー検出は、伝統的なボルタンメトリー検出に比し、優れた選択性及び感度なので利用できる (Singhal, P., Kawagoe, K. T., Christian, C. N., 及びKuhr, W. G., (1997) Anal. Chem. 69, 1662-1668)。この方法は、大きい振幅の正弦波形を使用して、電極面上を電極窓を横断してスキャンする。伝統的なアプローチが時間に対する電気化学シグナルを観察するのに代えて、この技術は、電気化学シグナルの調和アイソレーション及びデジタル相ロッキングに依る。それは、定電位検出の少なくとも2桁大きい感度であり、かつ循環ボルタンメトリー検出より4桁まで大きい感度である。ナノモル程度の種々の炭水化物 (Singhal, P., Kawagoe, K. T., Christian, C. N., 及びKuhr, W. G., (1997) Anal. Chem. 69, 1662-1668) 及びヌクレオチド (Singhal, P. 及びKuhr, W. G., (1997) Anal. Chem. 69, 3552-3557)、及びピコモル程度のオリゴヌクレオチド及びDNA (Singhal, P. 及びKuhr, W. G., (1997) Anal. Chem. 69, 3552-3557) が、この方法で検出されうる。ポリメラーゼ伸長を利用する配列決定及び遺伝子分類用途におけるシグナル対ノイズを高める別のアプローチは、伸長又はPCR反応でレドックス標識化されたdTNP sを使用して、複数の標識が分子決定すべき各断片中に導入される。

【0020】

上述のすべてのアプローチは、レドックス活性標識を検出するために1種の電極材料 (白金) のみを必要とする。電極として他の金属を利用しても選択的検出を達成できる。例えば、銅電極は、プリン及びピリミジン塩基の両ヌクレオチドを電気触媒的に酸化することが示されている (Singhal, P. 及びKuhr, W. G., (1997) Anal. Chem. 69, 3552-3557)。そこで、DNA配列決定の場合は、すべての4つの白金電極の使用に代えて、1つの電極を銅から作ることができる。この電極は、基本的に検出器末端における各DNA断片の到着用カウンターとして作用する。そして、3つの他の電極を使用して、3つの異なる標識化塩基を検出することができる。このような3色の組合せコード化法は、最近、Kheterpalらによって詳細に記載され (Kheterpal, I., Li, L. Speed, T. P. 及びMathies, R. A., (1998) Electr

ophoresis 19, 1403-1414)、かつ蛍光に基づくDNA配列決定について非常にうまくいくことが示された。従って、このアプローチは、以前に記載された方法で必要とされる4つの標識の代わりに、3つのみのレドックス活性標識の合成が必要である。このアプローチは、シグナルが相互に容易に分解される、より簡単な標識化及び検出方法を実現することができる。

【0021】

レドックス活性標識は、多種多様の合成アプローチによって、問題の種々の検体に結合させることができる。M-13試料のための2-(1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸)のDNAプライマーへの結合は、この研究では、レドックス活性標識をオリゴヌクレオチドに付けるのに使用される合成経路の例として示されている。まず、図7の上部に示されるスキームによって、2の活性なN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを合成した。そして、その活性誘導体を5'-アミノヘキシル-末端プライマーと連結することによって、電気化学的に活性なDNAプローブを調製した。この手順は、伝統的なヌクレオシドホスホラミダイト化学を利用する5'-アミノ機能化プライマーオリゴヌクレオチドの初期固相合成を含む。この後に、1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルに、CPG固体担体オリゴヌクレオチドを接合した。次いで、この担体を水酸化アンモニウム水溶液にさらして、完全に脱保護されたプライマー接合体を遊離させ、逆相HPLCで精製した。図8は、ヒドロキノン標識の結合後のM-13プライマーの高感度検出を示している。この標識化された検体の質量検出限界はzeptomolの範囲内であり、誘導体化がレドックス活性標識の高感度検出に有害でないことを示している。また、それらの標識は電荷のない低分子量化合物なので、その結合によって、検体の移動度はいかなる変化も生じない。このことは、分離の分解能及び効率が何ら低下することなく、現存の分離条件を標識化検体に容易に使用できることを意味している。また、異なった標識と接合されたDNA断片の2つの異なるセットを分析するとき、移動度シフト補正のための難解かつ不完全なソフトウェアの問題も不要である。これら低分子標識の他の利点は、プライマーに接合された場合、それらは、PCR又は他の増幅、伸長若しくは連結過程の際、該プライマー又はオリゴヌクレオチドがハイブリダイズされるDN

A断片の増幅のためのいかなる立体的又は他の障害が存在しないことである。図9は、レドックス標識1で標識化されたM-13正プライマー及び標識化されないM-13逆プライマーによるPCR増幅後、ベクター中に閉鎖された735bpのAnabena DNA挿入断片の電気泳動分離及び検出を示す。この断片の検出は、レドックス標識化DNAプライマーを使用して、現在PCRに用いられ、かつEC検出によるCEで分析される標準的な手順で、DNAを増幅できることを示している。このように、レドックス標識化プライマー、標識化オリゴヌクレオチドトリホスフェート、標識化ジデオキシヌクレオチドトリホスフェート又は標識化オリゴヌクレオチドが、多種多様のポリメラーゼによるDNA配列決定伸長反応の遂行、及び／又は連結後の連結された断片のサイズ解析の遂行、及び／又は全タイプのPCR増幅若しくはローリングサークル増幅法後の増幅された生成物のサイズ解析の遂行に成功するであろうと考えられるあらゆる理由がある。

【0022】

上述の誘導体化法と同様に、他のレドックス活性標識の活性なN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを合成し、かつ5'-アミノヘキシル末端DNAに結合させることができる。図10(A)は、本研究で用いる標識1、3及び4用の活性エステルを調製する合成経路を示す。これらのレドックス活性標識は、DNA鎖ターミネーターに結合させることもでき、多くの利点を与える。従って、レドックス活性ターミネーターから生成されるDNA配列決定断片のみを検出することができる。アルキニルアミノ-ヌクレオシドトリホスフェートは、DNA配列決定における鎖ターミネーターとして有用であるとして報告されている(Habbs, F. 及びCocuzza, A. 1987, 特許第5,047,519号)。A、G、C、Tのレドックス活性アルキニルアミノ-ヌクレオシドトリホスフェートは、レドックス活性標識の活性N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを、アルキニルアミノヌクレオシドトリホスフェートと反応させることによるアミド結合によって調製できる。同様の方法を、3'-OH基を有するレドックス標識dNTPsに使用でき、かつ伸長反応に使用できる。さらに、標識化はキノン/ヒドロキノン化合物に限定されない。メタロポルフィリンのような他のレドックス活性標識の活性エステルは、図10(B)に示されるように調製できる。RNA、PNA、ペプチド、タンパク質

、炭水化物、アミノ酸及び他の分子のような種々の他の化合物も、文献に広範に記載されている標識の接合のための多種多様な合成スキームを用いて、電気化学標識で標識化できる。(Bioconjugate Techniques, G. 7. Hermanson, Academic Press, NY (1996))。次いで、これらの化合物は、上述のCE-ECチップを基礎とするシステム及びコード一覧表を用いて検出されうる。図11は、この概念を用いて2つの検体を同時に検出する例を示す。図1に記載されたのと同様のCE-ECチップを使用した、作用電極は2つだけである。そして、CZE分離後、両方の作用電極において、+0.8ボルトでドーパミンとカテコールの両方が検出された。2つの電極を異なる電位に合わせ、これら2つの検体を同時に選択的に検出した。この場合、ドーパミンのみが、+0.3ボルトの低い電位に合わせた電極#1で検出された。+0.8ボルトに合わせた電極#2では、ドーパミンとカテコールの両方が検出された。従って、カテコールについてはマトリックス値が(0, 1)であり、ドーパミンについてはマトリックス値が(1, 1)である。この研究は、CE-チャンネルの外側に複数の作用電極をマイクロ製作することによってCE-ECチップを使用して、多重検出が達成されうることを直接的に実証している。

【0023】

図12は、分岐された分離チャンネルを利用することを除き、図1と同様のマイクロ製作チップを示す。同様の部分には同様の参照番号を付した。この実施形態では、単一のCE-チャンネルが、その出口端の直前で多数の小さい分岐B1、B2、B3、B4に枝分かれしている。分岐数は、検出される電気化学的標識の数に対応する。検出電極1、2、3又は4は、各分岐の出口でマイクロ製作され、特定の分岐からの溶出剤用の検出部として働く。この様式では、各チャンネル分岐中の溶出緩衝液流から1つだけの検体の検出用に各電極を釣り合わせることができる。これは、検体の感度は何ら損失することなく、電極を相互に離して(>10~15 μm)配置できるので、種々の電極間の拡散的及び電気的クロストークを最小化する。

【0024】

高い電気泳動電流からの干渉は、作用電極にかけられた電圧の可変性低下を導

き、 $I R$ 低下として知られる (I は電気泳動電流であり、 R は作用電極と参照電極との間の溶液の抵抗である)。 $I R$ 低下は、電極電位の予測不可能なシフトを生じさせ、結果として電気化学シグナルの高いバックグラウンドノイズを導く。参照電極は、マイクロ製作によって正確かつ永久的に作用電極に非常に近接して ($\sim 100\text{--}200\ \mu\text{m}$) 配置させることができる。これは、溶液の抵抗を有意に減少させることによって、いかなる $I R$ 低下も最小にする (R は作用電極と参照電極との間の距離に比例するので)。参照電極の組込みも、より安定なバックグラウンドシグナルを有するより頑強な $CE-EC$ チップを導く。

【0025】

$Ag/AgCl$ 参照電極を $CE-EC$ チップ上に組み込むことができる。銀 (Ag) は、 $CE-EC$ チップ上に析出されている別の金属上に直接析出又は電気メッキされうる。直接析出は、スパッタリング又は文献に記載されている他の通常用いられる金属析出法によって行うことができる。第2のアプローチでは、上述のようにマイクロ製作された Pt 電極上に Ag を電気メッキすることができる。 Pt 電極 (作用電極、補助電極、基底電極などを除いて) はマイクロ製作され、電気メッキによって $Ag/AgCl$ 電極に変換されうる。 Pt は、 Ag で電気メッキされ、次いで塩化物溶液中で酸化されてメッキされた Ag 上に $AgCl$ の沈殿物を生成し、それによって $Ag/AgCl$ 電極を与える。

【0026】

「符号付き二進コード」一覧表を使用することによって、選択的に標識化し、かつレドックス活性標識を検出する方法について記載する。本方法は、電気泳動又はクロマトグラフ分離後、複数の標識を同時に選択的に検出することを可能にする。 $CE-EC$ によるDNA配列決定で4つの異なる塩基を同定するのに使用できる、4つの異なる電気活性の標識についての特定の適用について詳述する。作用電極の数を増やすことによって、本方法及びマイクロチップをいくつでも異なる電気活性標識に適用できることは明かである。さらに、本方法は、RNA、PNA、ペプチド、タンパク質、アミノ酸、炭水化物及び他の化合物も、レドックス活性標識で標識化されうるので、又は検体自体が特異的なレドックス特性を有する場合は、それらにも容易に拡張される。レドックス活性標識による標識化

は、本質的に非電気活性化合物をEC検出に対して敏感に反応するようにする。種々の標識化検体間の選択性は、レドックス電位及び／又は電極面で反応する際のそれらの反応速度論を識別することによって達成される。シグナルは、特異的なマトリックス値を有する各標識についてのコード化マトリックスを使用することによって効率的にお互いから区別される。この方法は、複数の電気化学的標識の同時検出及び同定のための非常に正確なアプローチを保証する。従って、単一の分離での複数検体の検出が、非常に高い選択性及び信頼性で、かつ光学的検出の欠点なしに為されうる。また本発明を実施するためのマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップについても記載されている。しかし、選択的標識化及び検出方法を他の分離装置に適用できることは明かである。

【0027】

説明の目的のため、上述の記載は、特定の専門用語を用いて、本発明の完全な理解を与えた。しかし、特定の詳細は本発明を実施するために必要でないことは、本技術の当業者には明かだろう。本発明の特定の実施形態に関する上記記述は、例示及び説明の目的のためにある。それらは、網羅的又は開示された正確な形態に本発明を限定する意図ではない；上記教示を考慮すると、明らかに多くの変更及び変形が可能である。実施形態は、本発明の原理及びその実際的な適用を最もよく説明し、それによって、本技術の当業者が本発明及び考慮される特定用途に合わせるように種々の変更を有する種々の実施形態を利用できるようにするために選択され、記載された。本発明の範囲は、特許請求の範囲及びその均等物によって定義されるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の一実施形態のマイクロ製作キャピラリー電気泳動チップを示す。

【図2】

電気化学的検出用の標識として使用するいくつかのヒドロキノン／キノン誘導体のレドックス電位を示す。(CRC Handbook Series in Organic Electrochemistry, Vol. 1-5, Eds. Mertes, Zuman, Scott, Campbell, Kardos, Fenner, Rupp, CRC Press, Inc.)

【図 3】

2つの酸化性標識と2つの還元性標識を利用した複数標識の選択的な電気化学的検出用のコード化フォーマットを示す。ここで、 $|V_2| > |V_1|$ かつ $|V_4| > |V_3|$ である。

【図 4 A】

Ag/AgCl に対する +0.9ボルトにおける 1 (1, 4-ジヒドロキノン) の選択的な電気化学的検出を示すが、0.6ボルトでは検出されない。1のマトリックス値は (0, 1) である。

【図 4 B】

+0.6及び+0.9ボルトの両方における 2 (1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸) の電気化学的検出を示す。2のマトリックス値は (+1, +1) である。

【図 5 A】

-0.4ボルトにおける 3 (メチル-1, 4-ベンゾキノン) の選択的な電気化学的検出を示すが、そのシグナルは電位を -0.2ボルト以下に下げることによって完全になくなる。3のマトリックス値は (0, -1) である。

【図 5 B】

-0.2及び-0.4ボルトの両方における 4 (2, 5-ジクロロ-1, 4-ベンゾキノン) の選択的な電気化学的検出を示す。4のマトリックス値は (-1, -1) である。

【図 6】

4つの酸化性標識と4つの還元性標識を利用した複数標識の選択的な電気化学的検出用のコード化フォーマットを示す。ここで、 $|V_1| < |V_2| < |V_3| < |V_4|$ である。

【図 7】

レドックス活性標識でDNAを標識化して、その接合体を電気活性にするための合成スキームを示す。

【図 8】

1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸が付加されたM-13 DNA-プライマーの、電気化学チップを用いたキャピラリー電気泳動電気化学的検出を示す。

【図 9】

EC-標識化M-13プライマーを使用して、増幅後に得られたPCR生成物のキャピラリーゲル電気泳動的分離及びEC-検出を示す。該生成物は、分離マトリックスとして0.75% HECを用いてEC-CEチップ中で分離された。

【図10A】

電気化学的検出用のキノン又はヒドロキノン誘導体のレドックス活性標識の活性エステルへの合成経路案を示す。

【図10B】

多重電気化学的検出用のメタロポルフィリンのレドックス活性標識の活性エステルへの合成経路案を示す。

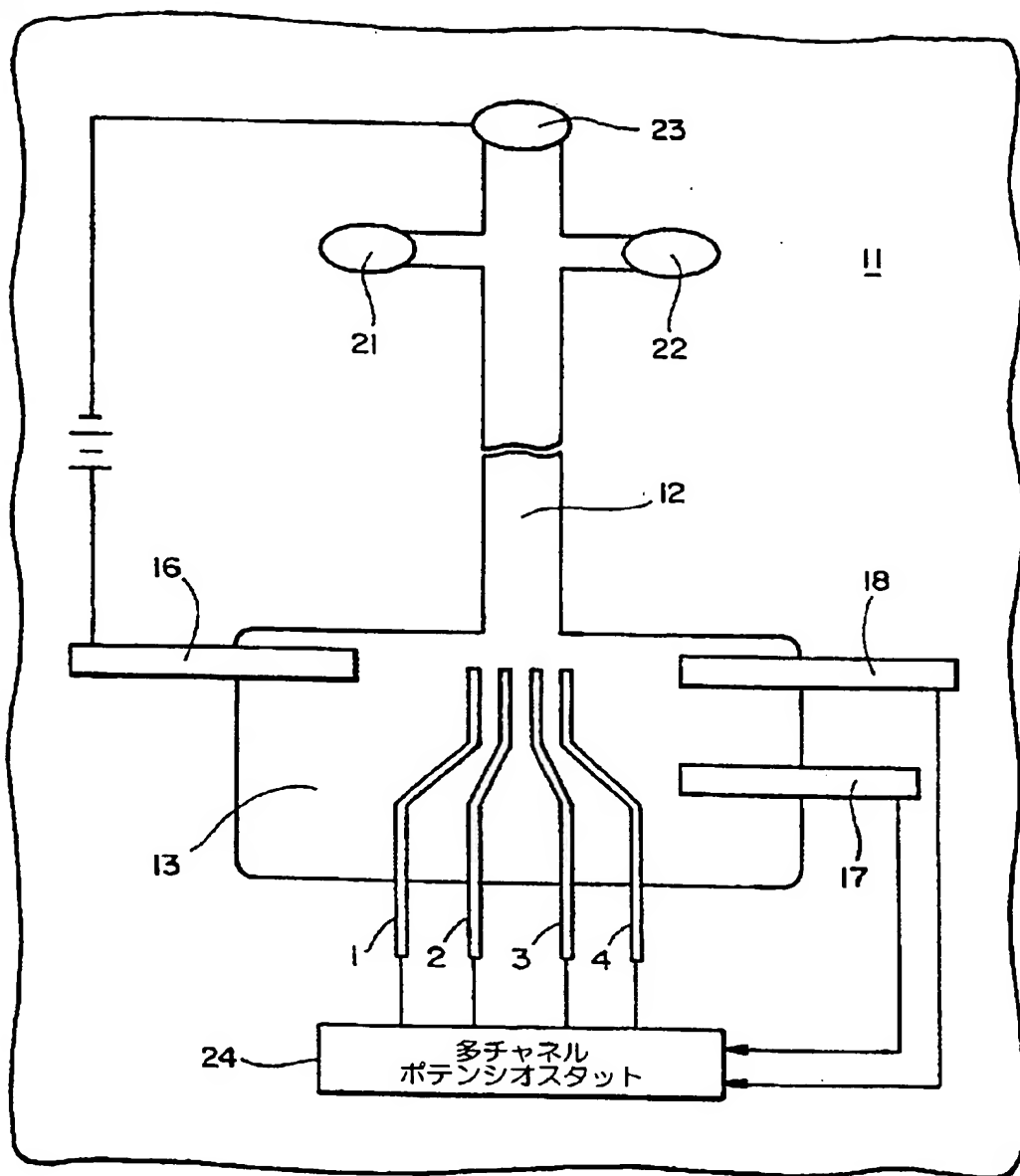
【図11】

図1に示される設計の電気化学チップを用いた2つの検体の同時多重検出を示す。

【図12】

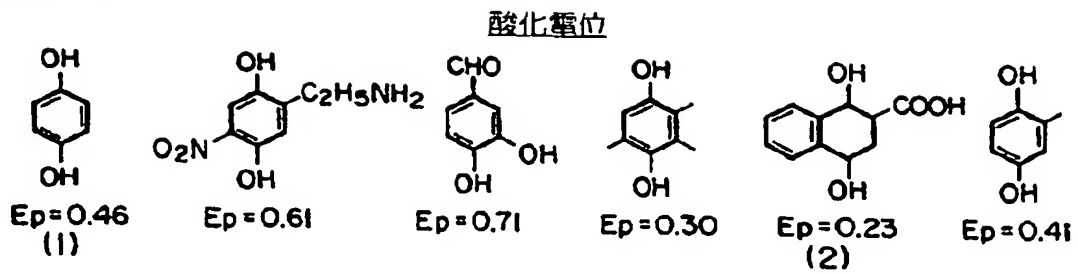
本発明の他の実施形態のマイクロ製作キャピラリー電気化学チップを示す。

【図1】



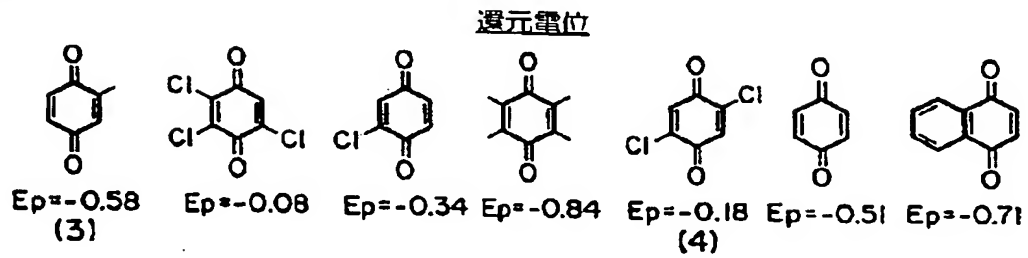
FIG_1

【圖 2 A】



FIG_2A

【圖 2 B】



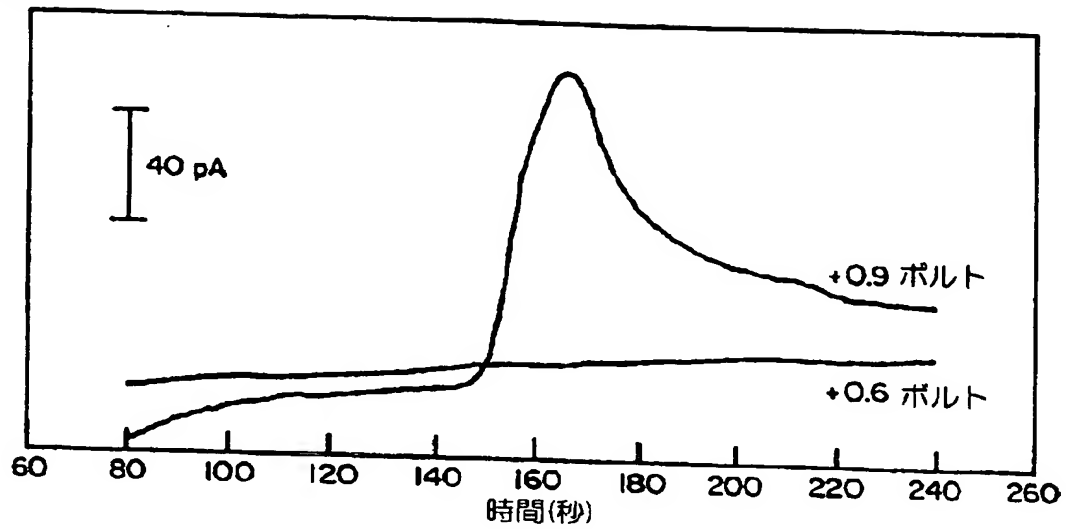
FIG_2B

【圖 3】

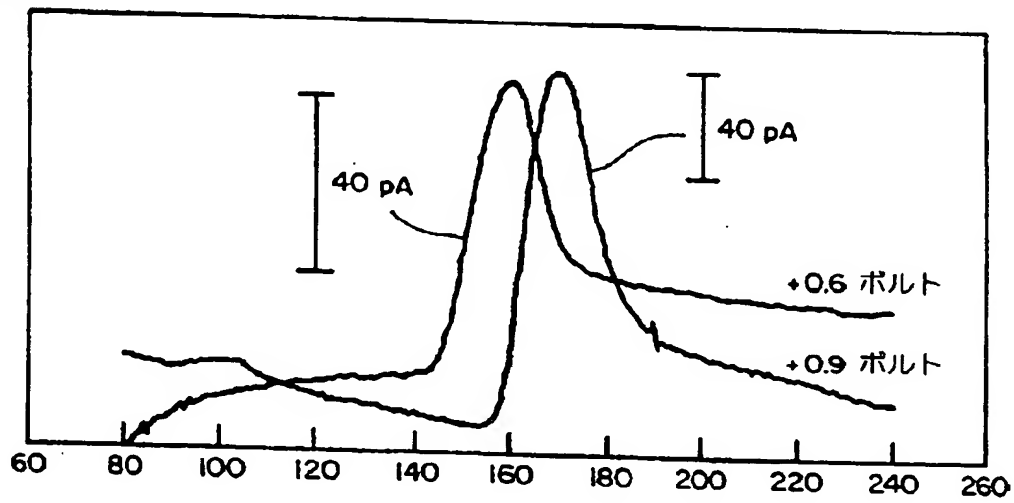
印加電位	標識			
	1	2	3	4
+V ₁	0	+1	-	-
+V ₂	+1	+1	-	-
-V ₃	-	-	0	-1
-V ₄	-	-	-1	-1

FIG_3

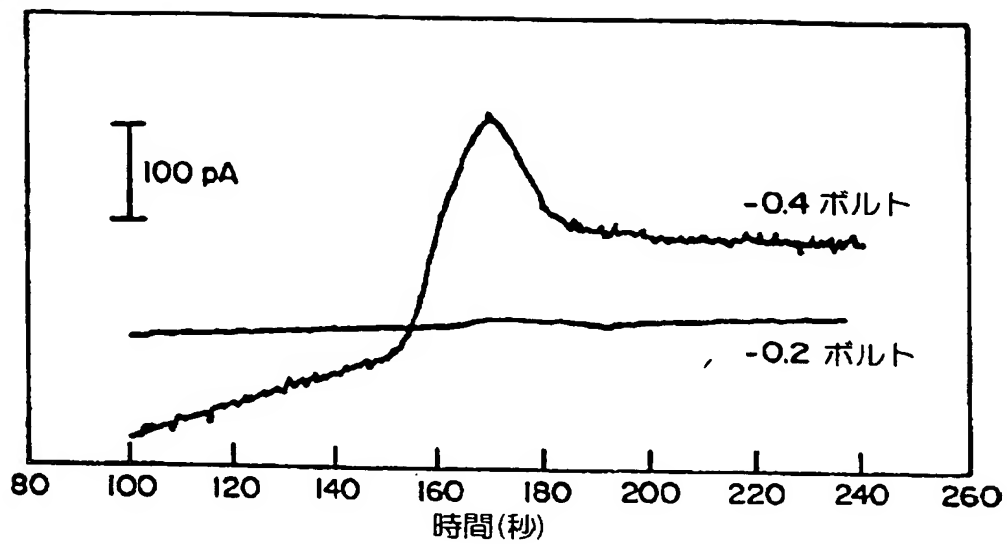
【図 4 A】

**FIG_4A**

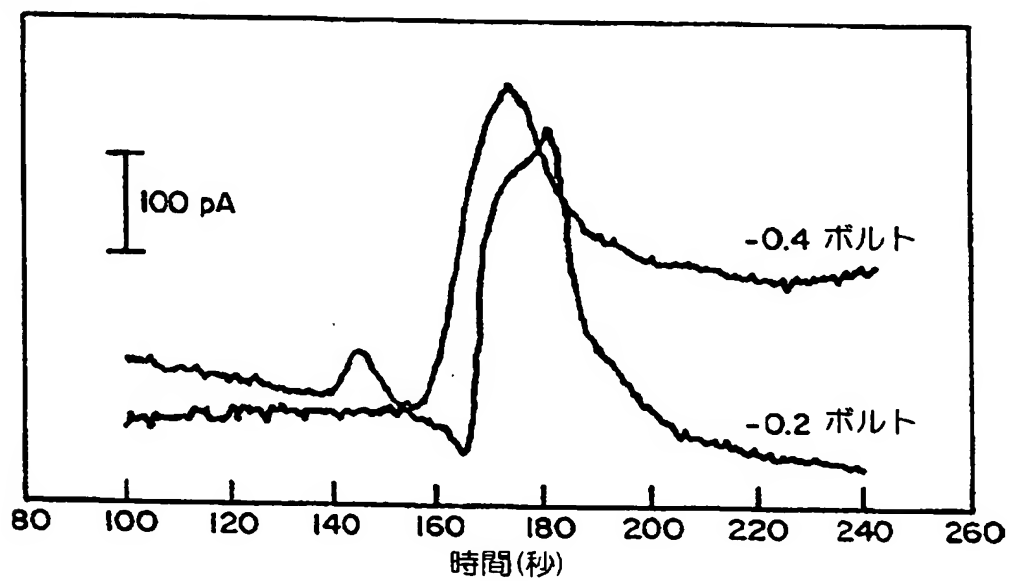
【図 4 B】

**FIG_4B**

【図 5 A】

**FIG_5A**

【図 5 B】

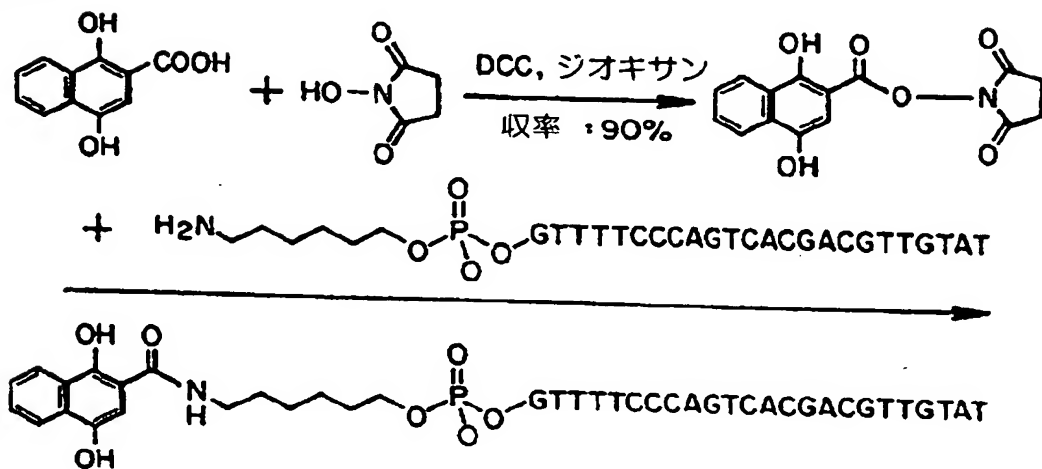
**FIG_5B**

【図 6】

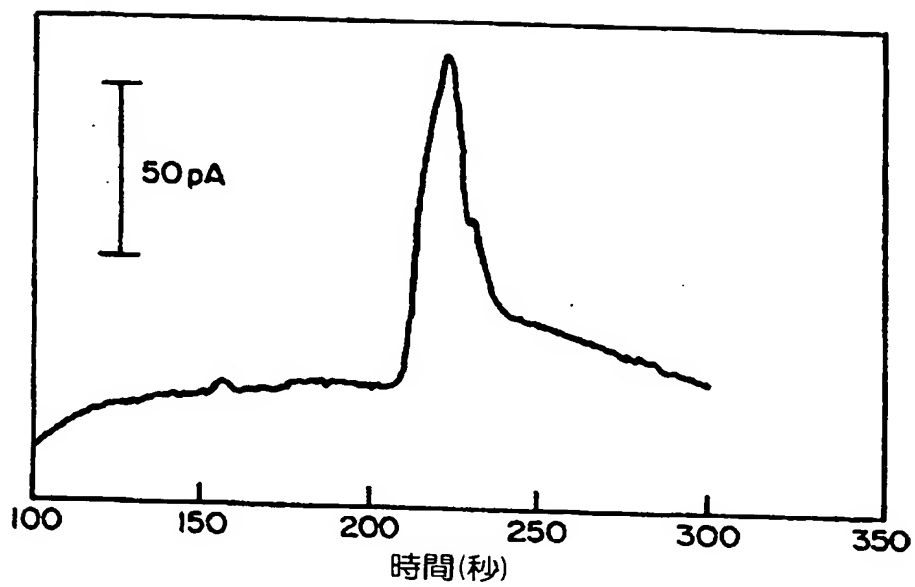
印加電位	標識			
	1	2	3	4
V ₁	1	0	0	0
V ₂	1	1	0	0
V ₃	1	1	1	0
V ₄	1	1	1	1

FIG_6

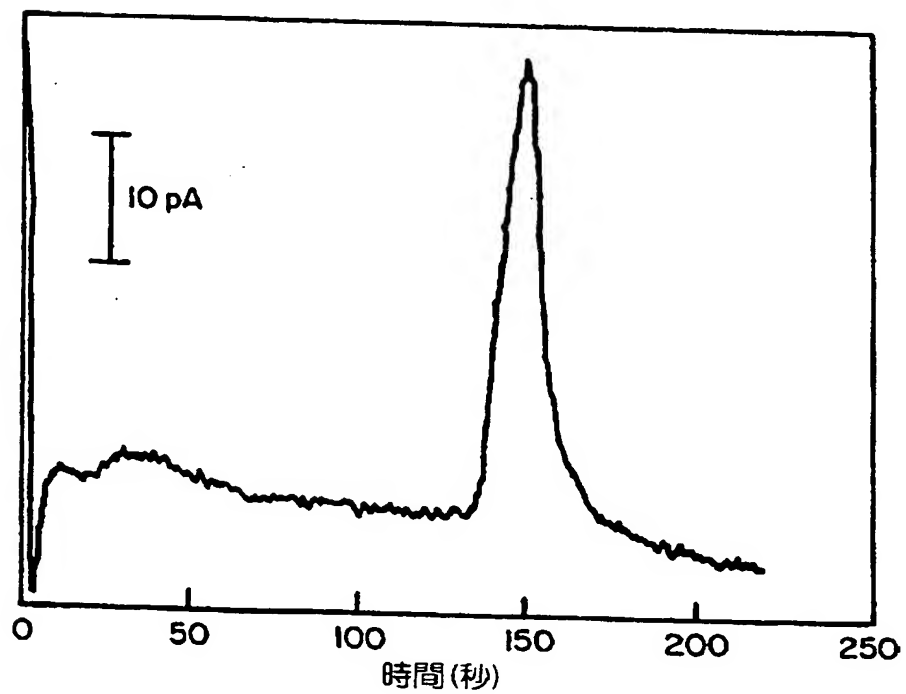
【図 7】

**FIG_7**

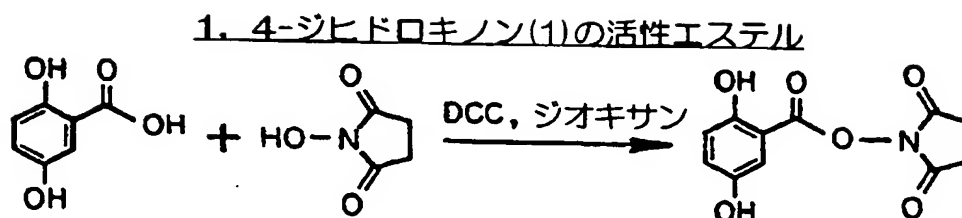
【図 8】

**FIG_8**

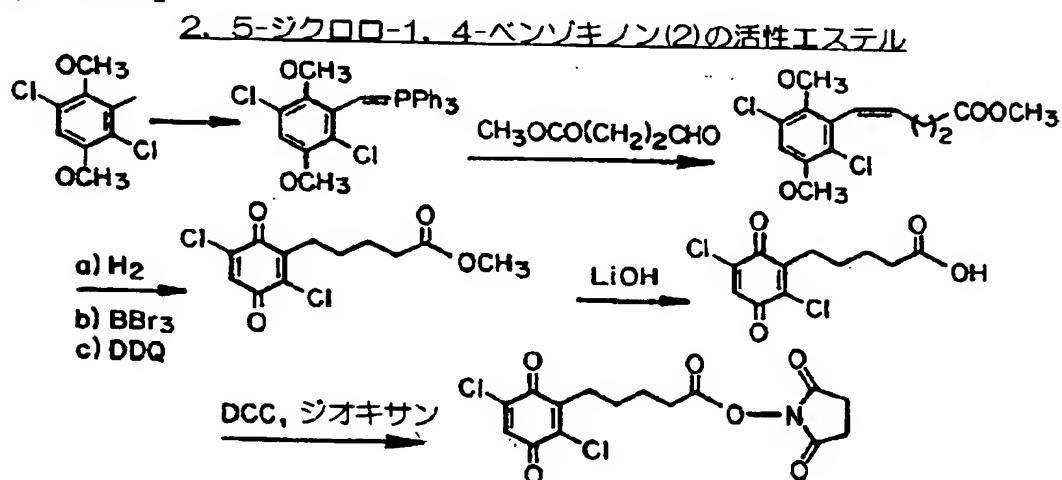
【図 9】

**FIG_9**

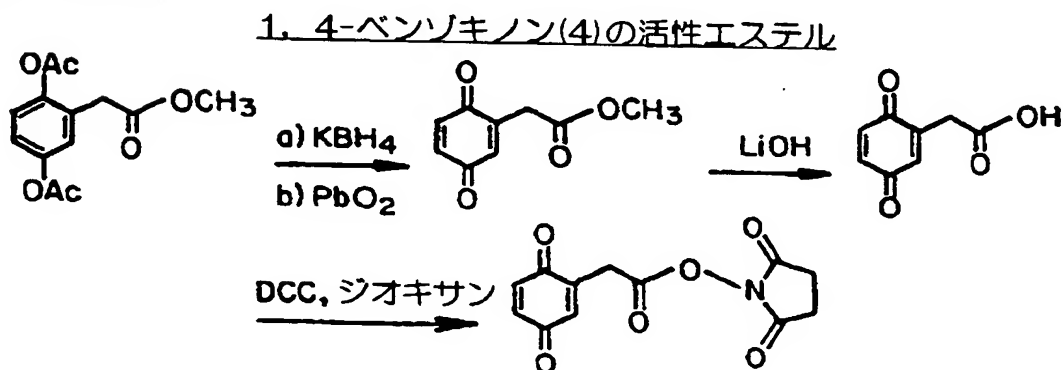
【図10A1】

**FIG_10A1**

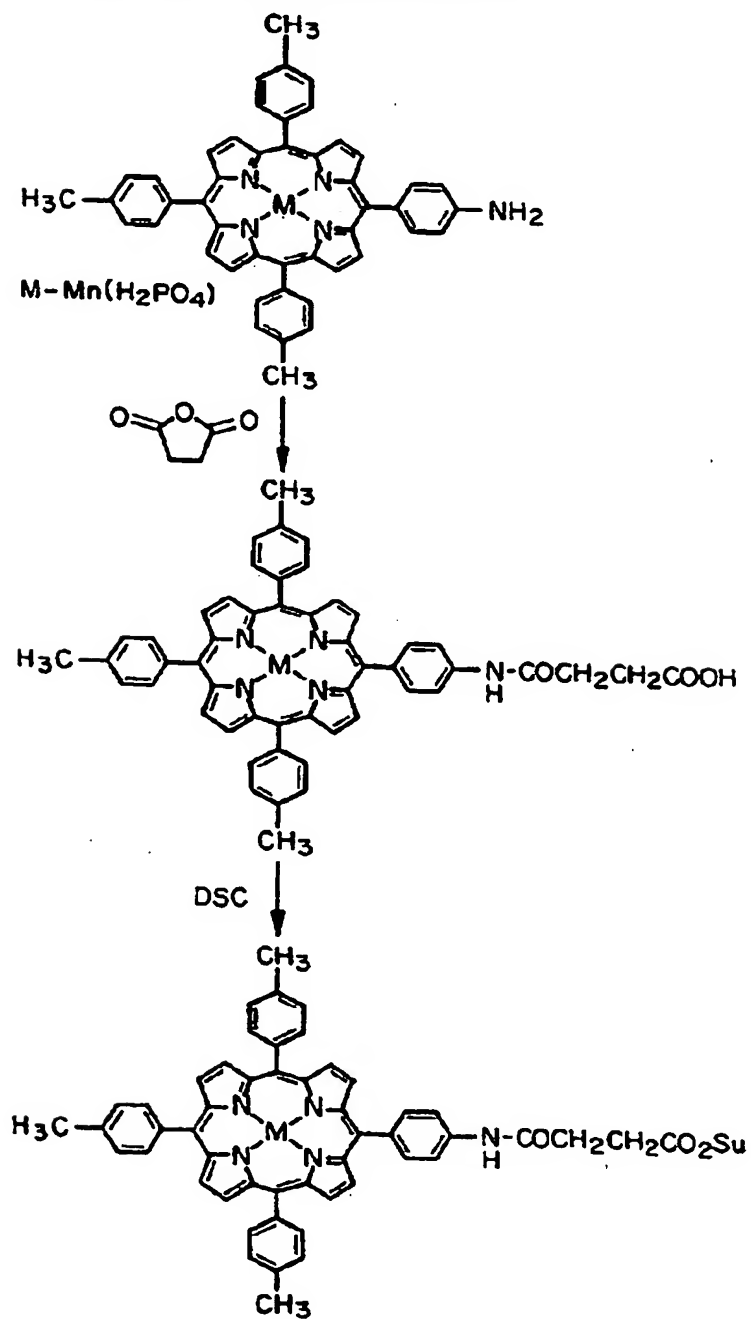
【図10A2】

**FIG_10A2**

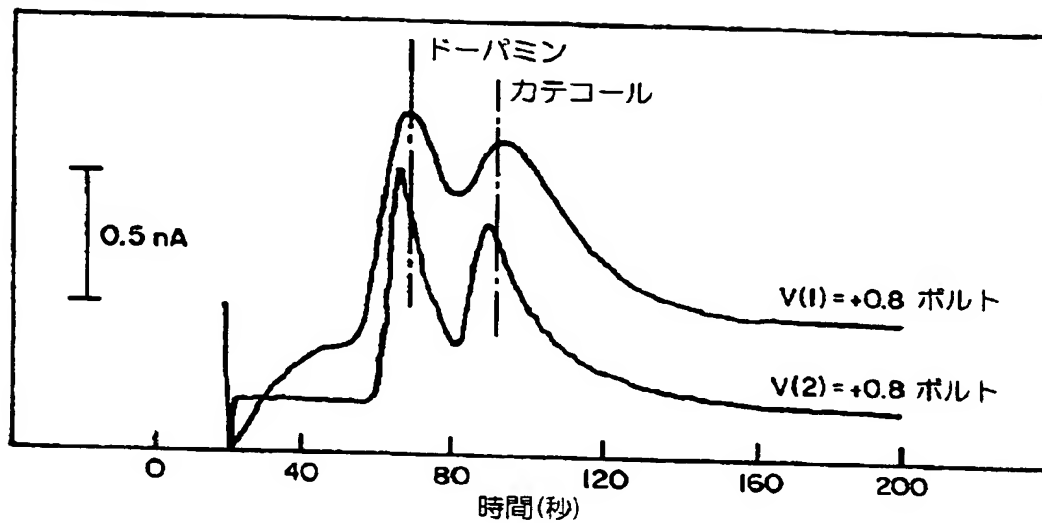
【図10A3】

**FIG_10A3**

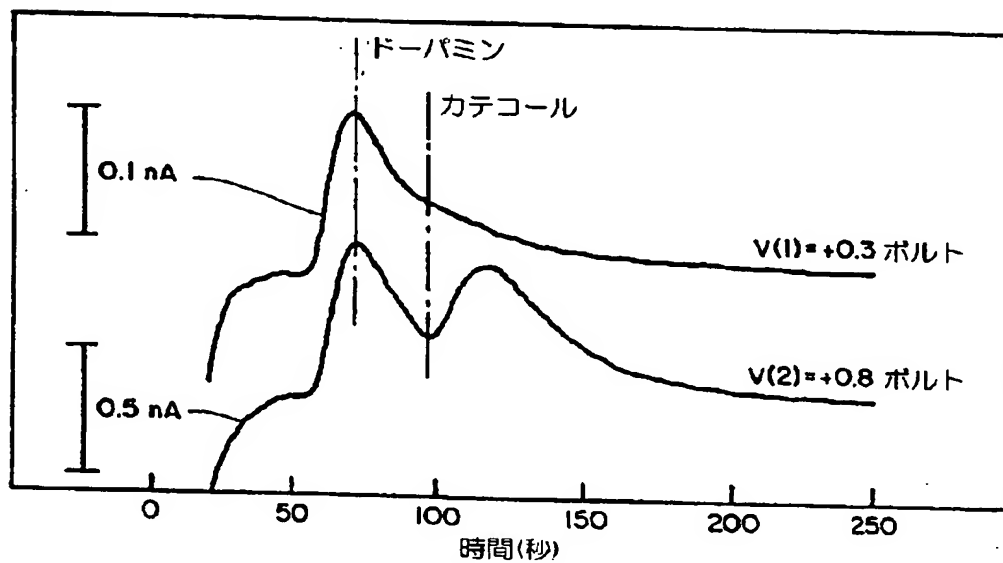
【図10B】

メタロポルフィリンの活性エステル**FIG. 10B**

【図 1 1 A】

**FIG_IIA**

【図 1 1 B】

**FIG_IIB**

FIG_12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 GOIN27/447		International Application No. PCT/US 99/27495
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 GOIN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 09161 A (UNIV CALIFORNIA) 5 March 1998 (1998-03-05) cited in the application page 6, line 25 - page 8, line 32 page 10, line 29 - line 32; figure 18	1,8,15, 22,26, 35,43
Y	WO 95 10040 A (DREW SCIENT LTD ;POLYMER LAB LTD (GB); BIRKBECK COLLEGE (GB); SLAT) 13 April 1995 (1995-04-13) page 3, line 27 - page 6, line 4; figures 2,3	1,8,15, 22,26, 35,43
A	WO 97 12995 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 10 April 1997 (1997-04-10) claim 3	8
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "d" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 March 2000		Date of mailing of the international search report 07/04/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Duchatellier, M

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/27495

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 49549 A (ORION RESEARCH) 5 November 1998 (1998-11-05) claims 1-7 ---	1
A	SINGHAL P ET AL: "DIRECT ELECTROCHEMICAL DETECTION OF PURINE- AND PYRIMIDINE-BASED NUCLEOTIDES WITH SINUSOIDAL VOLTAMMETRY" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, vol. 69, no. 17, 1 September 1997 (1997-09-01), pages 3552-3557, XP000865588 ISSN: 0003-2700 cited in the application the whole document -----	11, 12, 18, 19, 29, 30, 45, 46

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/US 99/27495

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9809161	A	05-03-1998	US 5906723 A	25-05-1999
			AU 714163 B	23-12-1999
			AU 4090597 A	19-03-1998
			CN 1235674 A	17-11-1999
			EP 0922218 A	16-06-1999
WO 9510040	A	13-04-1995	EP 0722568 A	24-07-1996
WO 9712995	A	10-04-1997	EP 0854937 A	29-07-1998
			JP 11512617 T	02-11-1999
WO 9849549	A	05-11-1998	AU 7170298 A	24-11-1998

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 シンガール パンカイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

94704 バークレイ デュラント アベニュー 2000-#116

(72) 発明者 シー イン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

94596 ウォルナット クリーク クリークサイド ドライヴ 1355-#203

(72) 発明者 グレイザー アレクサンダー エヌ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

94563 オリンダ キャノン ドライヴ 135

Fターム(参考) 2G045 DA12 DA13 FB05 FB07